



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학석사 학위논문

사람 pre-naïve B 세포의 조절  
세포로서의 역할에 대한 연구

**Characterization of unique  
population of human pre-naïve B  
cells with regulatory functions**

2013 년 2 월

서울대학교 대학원

의학과 석사과정

심 지 현

**A thesis of the Master's degree**

**Characterization of unique  
population of human pre-naïve B  
cells with regulatory functions**

**사람 pre-naïve B 세포의 조절  
세포로서의 역할에 대한 연구**

**February 2013**

**The Department of Anatomy,**

**Seoul National University**

**College of Medicine**

**Ji Hyun Sim**

# 사람 pre-naïve B 세포의 조절 세포로서의 역할에 대한 연구

지도교수 김 항 래

이 논문을 의학석사 학위논문으로 제출함

2012 년 10 월

서울대학교 대학원

의학과 해부학 전공

심지현

심지현의 의학석사 학위논문을 인준함

2012 년 12 월

위 원 장 (인)

부위원장 (인)

위 원 (인)

# **Characterization of unique population of human pre-naïve B cells with regulatory functions**

**by**

**Ji Hyun Sim**

**A thesis submitted to the Department of Medicine in  
partial fulfillment of the requirements for the Degree of  
Master of Science in Medicine (Anatomy) at Seoul  
National University College of Medicine**

**December 2012**

**Approved by Thesis Committee:**

**Professor \_\_\_\_\_Chairman**

**Professor \_\_\_\_\_Vice chairman**

**Professor \_\_\_\_\_**

# 초 록

**서론:** 사람의 말초혈액 내에 순환 하고 있는 pre-naïve B 세포는 transitional B 세포와 naïve B 세포의 중간단계의 특징을 보이는 것으로 밝혀져 있다. 그러나 pre-naïve B 세포의 기능에 대해서 자세히 알려진 바가 없다. 다만, 생쥐에서 사람 pre-naïve B 세포와 발달단계가 유사한 T2-marginal zone precursor(MZP) B 세포가 interleukin(IL) -10을 생성하는 조절세포로서(regulatory B cells, Bregs) 면역억제기능을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 사람 pre-naïve B 세포가 IL-10을 생성함으로써 T 세포 증식과 cytokine 생성을 억제하는 조절세포로서의 기능이 있는지 알아보려고 하였다.

**방법:** 사람의 말초혈액에서 pre-naïve B 세포를 분리하고, CD154(CD40L) 발현 세포를 이용한 CD40의 자극 조건에서 IL-10 생성능을 flow cytometry와 효소면역분석법으로 분석하였다. 또한 pre-naïve B 세포를 CD40의 자극 조건에서 CD4<sup>+</sup> T 세포를 같이 배양하여 T 세포의 증식과 cytokine 생성에 미치는 영향을 flow cytometry와 효소면역분석법으로 분석하였다.

**결과:** 건강한 사람으로부터 분리한 pre-naïve B 세포가 CD40 자극 하에 naïve B 세포, memory B 세포에 비해서 IL-10을 의미 있게 많이

생성함을 확인하였다. 또한 pre-naïve B 세포가 CD4<sup>+</sup> T 세포의 증식과 cytokine 생성을 억제하였다. 반면, 자가 면역질환인 전신성홍반성루푸스(루푸스, SLE) 환자의 pre-naïve B 세포는 CD40 자극을 주어도 정상인의 pre-naïve B 세포만큼의 IL-10를 생성하지 못 하였다.

**결론:** 따라서 pre-naïve B 세포는 사람 말초혈액에 존재하는 독특한 B 세포군으로서 정상인의 면역반응을 조절하는 세포로의 역할을 보이며, 면역학적 항상성과 자가 항원에 대한 관용 유지에 매우 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

---

**주요어:** Pre-naïve B 세포, 조절 B 세포, Interleukin-10 (IL-10), 전신성홍반성루푸스

**학 번:** 2011-21887

## 목 차

초록 .....	1
목차 .....	3
표 및 그림 목록 .....	5
서론 .....	6
실험재료 및 방법 .....	13
1. 정상인과 루푸스 환자 모집	
2. 시약 및 세포 준비	
3. 세포 배양	
4. Cytokine 생성능력 측정	
5. 세포증식 측정	
6. 통계분석	
결과 .....	18
1. Pre-naïve B세포는 CD40 자극을 주었을 때 IL-10을 생성함.	
2. Pre-naïve B 세포가 CD4 <sup>+</sup> T 세포의 증식 및 cytokine 을 억제함.	
3. 루푸스 환자의 pre-naïve B 세포는 IL-10을 적게 생성함.	
고찰 .....	29



참고문헌 .....	33
초록 (영문) .....	37

## 표 및 그림 목록

Figure 1. Sorting scheme of pre-naïve B cells .....	20
Figure 2. IL-10-producing B cells are enriched within pre-naïve B cells population in healthy subjects .....	21
Figure 3. Pre-naïve B cells suppressed proliferation and cytokine production of CD4 <sup>+</sup> T cells .....	24
Figure 4. Pre-naïve B cells from SLE patients were defect in producing IL-10 .....	27

## 서론

사람의 B 세포 발달 단계를 보면, 모든 세포로 분화가 가능한 조혈모세포(hematopoietic stem cell, HSC)가 골수에서 pro-B 세포로 분화 한 후, pre-B 세포로 분화하여 immunoglobulin(Ig)의 다양한 유전자 재조합을 시작한다. 그 후, immature B 세포로 분화해 비로서 특정 항체를 인식할 수 있는 IgM 수용체를 세포 표면에 발현 한다. Immature B 세포는 골수에서 자가항원을 인지하는 세포인 경우 음성선택을 통해 세포자살을 유도함으로서 사멸되거나, 수용체 편집(receptor editing, heavy chain 혹은 light chain) 단계를 거쳐서 말초혈액으로 이동한다. 그 후 transitional B 세포로의 분화 단계를 거쳐, mature naïve B 세포가 되고 2차 면역 기관인 림프절 또는 비장으로 이동하여 항원 침입 시 활성화가 된 T 세포에 의해 plasma 세포로 분화한다. 이로서 plasma 세포는 특정 항원에 대한 항체를 만듦으로서 획득면역 반응에 참여하게 되고, 일부 세포는 기억 B 세포(memory B)로 남아 같은 항원의 침입에 보다 빠르고, 강하게 반응하게 된다(1-3).

일반적으로 B 세포는 일련의 발달 과정을 통해 최종적으로 항체를 생성하고  $CD4^+$  T 세포 활성을 돕기 때문에 긍정적인 면역

참여자로 생각 되어 왔다(4). 하지만 자가면역질환 환자의 경우 B 세포가 자가항원에 대한 자가항체를 만드는 것이 발병에 중요한 기전으로 밝혀지면서 자가항원에 대한 항체를 생성하는 B 세포 혹은 전체 B 세포를 제거하고자 하는 많은 연구가 있고, 실제로 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis, RA) 환자에서 B 세포를 없애는 CD20에 대한 rituximab이 임상적으로 사용되고 있다(5).

한편으로 1990년대에 자가면역질환과 염증유발 동물 모델인 contact hypersensitivity(CHS), experimental autoimmune encephalomyelitis(EAE), chronic colitis, 그리고 collagen-induced arthritis(CIA)에서 또 다른 B 세포의 역할이 밝혀졌다. 즉, 이러한 질환모델에서 B 세포를 없애거나 줄일 경우 병의 증상이 더 심각해지는 것이 밝혀지면서 면역반응을 조절하는 조절 B 세포(regulatory B cells, Bregs)의 존재가 대두되고, 이에 대한 많은 연구결과 negative regulator로서의 B 세포의 실체가 밝혀졌다(6-13). 현재까지 생쥐에서 밝혀진 조절 B 세포로는 비장에 존재하는 CD5<sup>+</sup> B-1a B 세포, CD19<sup>hi</sup>CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup>(IL-10-producing B, B10) B 세포, CD1d<sup>hi</sup>CD21<sup>hi</sup>CD23<sup>hi</sup>CD24<sup>hi</sup>IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>lo</sup>(marginal zone, MZ) B 세포, CD19<sup>+</sup>CD1d<sup>hi</sup>CD21<sup>hi</sup>CD23<sup>hi</sup>CD24<sup>hi</sup>IgD<sup>hi</sup>IgM<sup>hi</sup>(transitional 2-marginal zone precursor, T2-MZP) B 세포들이 알려져 있다(14-20) 생쥐의 조절 B

세포와 유사한 사람의 조절 B 세포는 말초혈액에 존재하는  $CD24^{hi}CD27^{+}$ (B10) B 세포와(21),  $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$  B 세포로(22) 알려졌다.

조절 B 세포의 기능적인 특성은 다음과 같다. 생쥐의 태아시기에 생성되는 B-1 B 세포는 간에서 발달이 시작되며 최종적으로 복강과 비장에 위치하여 일반적인 후천성 면역반응이 있기 전, 자연항체(natural antibody)를 생산하는 것으로 알려져 있다(23). B-1 B 세포는 CD5의 발현에 따라  $CD5^{+}$  B-1a B 세포,  $CD5^{-}$  B-1b B 세포로 구분을 하며(23, 24), 비장에 있는  $CD5^{+}$  B-1a B 세포는 B-2 B 세포에서 유래된 조절 B 세포와 같이 항 염증성 cytokine인 interleukin-10(IL-10)을 생성함으로써 FasL/Fas-의존적인 기전으로  $CD4^{+}$  T 세포를 억제하는 것으로 알려져 있다(25, 26). 또한 비장에 존재하는  $CD19^{hi}CD1d^{hi}CD5^{+}$  B 세포는 시험관내에서 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)/ionomycin으로 자극을 주었을 경우 IL-10을 많이 발현해서 B10 세포라 명명이 되었으며, CD19의 발현이 없는 생쥐 모델에 B10 세포를 넣어준 경우 과도하게 증가된 면역세포의 활성이 감소한다고 알려져 있다(17). 그 외에도  $CD1d^{hi}CD21^{hi}CD23^{-}CD24^{hi}IgM^{hi}IgD^{lo}$ (MZ) B 세포가 생쥐의 대장염 모델에서 IL-10을 생성함으로써 대장염의 발달을 늦추고, MZ B 세포의 전구세포인

CD19<sup>+</sup>CD1d<sup>hi</sup>CD21<sup>hi</sup>CD23<sup>hi</sup>CD24<sup>hi</sup>IgD<sup>hi</sup>IgM<sup>hi</sup>(T2-MZP) B 세포 역시 collagen-induced arthritis 생쥐 모델에서 관절염을 완화시킨다고 보고되었다(20).

따라서 IL-10을 매개로 조절 역할을 하는 조절 세포의 중요성과 더불어 궁극적으로 조절세포를 자가면역질환 환자에 적용하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 사람의 말초혈액 내에 존재하는 CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>(B10) B 세포는 기생충에 감염된 multiple sclerosis(MS) 환자에서 IL-10을 매개로 T 세포의 증식과 IFN- $\gamma$  생산을 억제 함으로서 기생충에 감염된 증상을 완화시키는 것으로 밝혀졌다(27). 또한 CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B 세포 역시 IL-10을 통해 CD4<sup>+</sup> T 세포의 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제할 수 있으나, 루푸스 환자에서 CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B 세포 수가 상당히 늘어나 있음에도 불구하고 STAT-3의 인산화관련 신호전달 분자의 이상으로 IL-10 생성에 결함이 있다고 보고 되었다(22).

Pre-naïve B 세포는 2009년도에 새롭게 정의된 B 세포로서 (28), 사람의 말초혈액 내 transitional B 세포와 naïve B 세포 사이에 존재하는 발달단계 상 중간단계의 세포로 밝혀졌다. Pre-naïve B 세포는 말초혈액 내 CD19<sup>+</sup> B 세포 중 약 7%, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> B 세포 중에서 약 10%를 차지하고 있으며, transitional B 세포와 같이 CD5<sup>+</sup>

를 발현하지만 생쥐의 counterpart에는 존재하지 않는 것이 특징이다(29). 사람이 태아 상태일 때 말초혈액 내 대부분의 mature B 세포는 CD5를 발현하나(30), 성인이 되면서 11~49%로 그 빈도가 줄어들어 전체 CD5<sup>+</sup> 세포 중 transitional B 세포가 1~2%를 차지(31), 나머지 CD5<sup>+</sup>의 대부분이 pre-naïve B 세포인 것으로 밝혀졌다. Pre-naïve B 세포를 구별할 수 있는 가장 큰 marker는 CD38로 발달단계 상 transitional B 세포가 CD38을 가장 높게 발현하며(CD38<sup>hi</sup>), pre-naïve B 세포가 중간수준의 CD38을 발현(CD38<sup>int</sup>), naïve B 세포는 CD38을 거의 발현하지 않는다(CD38<sup>+</sup>). 그 외에도 pre-naïve B 세포는 CD9, CD10, R123 등의 발현이 낮은 naïve B 세포(CD9<sup>-</sup>CD10<sup>-</sup>R123<sup>-</sup>)와 발현이 높은 transitional B 세포(CD9<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>R123<sup>+</sup>) 사이의 중간 표현형을 보이고 있고(28), immature B 세포의 특징인 세포사멸이 높은 것과, mature B 세포의 특징인 plasma 세포로 분화하여 항체를 생성하고, 다른 세포에게 항원을 제시하는 능력을 모두 가지고 있는 것으로 보아 marker 뿐만 아니라 기능까지도 naïve B 세포와 transitional B 세포의 중간단계 일 것으로 추정하고 있다(28).

2010년 Blair 등이(22) 제시한 조절 B 세포인 CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B 세포는 표현형상으로 Lee 등이(28) 제시한 pre-naïve B 세포(CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD38<sup>int</sup>)와 상당히 유사한 것으로 보여진다.

즉, 두 세포 모두  $CD24^+$  이면서 동시에  $CD38$ 의 발현 정도에만 약간 차이가 있으며(22, 28), Blair 등이 제시한  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  B 세포는 transitional B 세포와 일부 pre-naïve B 세포를 포함하고 있는 것으로 보인다.  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  B 세포는 IL-10을 생성하여, IL-10을 매개로  $CD4^+$  T 세포의 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  생성을 억제하는 것이 보고 되었다(22). 다른 논문에 의하면 사람의 말초혈액 내  $CD5^+$  B 세포들이 IL-10을 생성 한다고 밝혀졌으나(32),  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  B 세포가 pre-naïve B 세포와 같이  $CD5^+$ 를 발현하는지는 확인된 바는 없다(22). 따라서 이러한 보고로부터, pre-naïve B 세포 역시 IL-10을 생성할 가능성이 있고, 조절 B 세포로서의 기능을 할 것이라는 예측할 수 있지만, 구체적으로 밝혀진 바가 없다. 또한 SLE 환자에서 pre-naïve B 세포 역시 상당수 증가되어 있는 것이 밝혀졌지만(28), IL-10 생성이나 그 기능의 이상에 대해서 알려진 바가 없다.

따라서 본 연구는 pre-naïve B 세포들이 단순히 발달단계상 naïve B 세포와 transitional B 세포의 중간단계를 차지하는 것 이외에 다른 기능을 갖는지를 알아보고자 하였다. 구체적으로 IL-10을 생성함으로써 조절세포의 역할을 하는지를  $CD4^+$  T 세포의 증식과 cytokine 생성 조절과 관련하여 분석하였다. 또한 SLE 환자에서 pre-



naïve B 세포의 IL-10 생성능력은 건강한 사람과 차이가 있는지  
알아보고자 하였다.

# 실험 재료 및 방법

## 1. 정상인과 루푸스 환자 모집

정상인과 루푸스 환자의 시료는 이화여자대학교 병원(승인번호, ECT 242-1-47), 서울대학교 병원(승인번호, H-C-1010-041-335)의 기관윤리위원회(IRB)에서 연구계획서를 승인 받은 후, 대상자들에게는 연구의 과정을 설명한 후 동의서를 받고 말초혈액을 채취하여 진행되었다. 시료는 이화여자대학교 병원에서 채취, 서울대학교 의과대학에서 실험을 수행하였고, 다양한 나이의 성인 남녀 중 면역 억제제 또는 잠재적으로 면역기관에 영향을 끼칠 수 있는 병을 가진 사람들은 연구에서 제외 되었으며 총 23명의 건강한 사람과 6명의 루푸스 환자가 참여하였다. 건강한 사람(평균 나이, 28세; 범위, 25-35세) 중 남성 11명, 여성 12명이 참여하였으며, 루푸스 환자(평균 나이, 40세; 범위, 25-64세)는 모두 여자가 참여하였다.

## 2. 시약 및 세포 준비

사람의 말초혈액에서 B 세포는 RosetteSep-Human B cell enrichment cocktail(StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada)을

제조회사의 사용법에 따라 negative selection 방법으로 분리하였다. B 세포는 항-CD20(PerCP), CD27(FITC), CD38(PE-Cy7) 항체로 염색하였다. 형광-결합된 항체는 모두 BD Bioscience사(San Diego, CA, USA) 제품을 사용하였으며, 타사 제품에 대해서만 따로 구입처를 표시하였다. 표면항원의 발현에 따라서  $CD20^+CD27^-CD38^{-/+}$ (Naïve B 세포),  $CD20^+CD27^-CD38^{Int}$ (Pre-naïve B 세포),  $CD20^+CD27^+$ (Memory B 세포) B 세포로 총 3 그룹을 BD FACS Aria(BD Immunocytometry, San Jose, CA, USA)를 이용하여 분리 하였다. 말초혈액 단핵구(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)는 Biocoll separating solution(Biochrom, Cambridge, UK)으로 분리하였으며, 항-CD4(APC-Cy7), CD25(PE) 항체로 염색한 후 FACS Aria로  $CD4^+CD25^-$  T 세포를 분리하였다.

### 3. 세포 배양

사람의 CD154(CD40L)를 발현하고 있는 생쥐의 섬유아세포인 L 세포(CD154-L 세포, Prof. Rizgar A. Mageed, Queen Mary University of London, UK로부터 제공 받음)는 5 % fetal bovine serum(FBS), L-glutamine, penicillin 과 streptomycin이 포함된 complete DMEM(Life Technologies, Grand Island, NY, USA)으로 배양하였다. CD154 발현은 주기적으로 항-CD154(PE) 항체로 염색하여 flow

cytometry(BD LSR II, BD Immunocytometry)로 확인하였다. 사람 T 세포와 B 세포는 10 % FBS, sodium pyruvate(Life Technologies), L-glutamine, penicillin, streptomycin이 포함되어 있는 RPMI 1640(Life Technologies)로 96-well plates에  $3 \times 10^4$  세포/200  $\mu$ l의 밀도로 배양하였다.

B 세포의 CD40를 자극하기 위해서, CD154-L 세포를 96-well flat bottom plate에 18 시간 동안 배양한 후 60 Gy로 조사하였고, 분리된 사람 B 세포를 1:10(CD154-L 세포:B 세포) 비율로 3 일 동안 배양하였다.

다른 실험을 위해서는 T 세포를 B 세포와 미리 배양된 CD154-L 세포와 1:10:10(CD154-L 세포:B 세포:T 세포)의 비율로 5일 동안 배양하였다.

#### **4. Cytokine 생성능력 측정**

세포내의 cytokine을 측정하기 위하여, 세포를 GolgiStop™ (monensin, BD Biosciences) 존재하에 50 ng/ml phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)과 1  $\mu$ g/ml ionomycin(Sigma-Aldrich)으로 전체 배양시간 중 마지막 6시간 동안 자극을 주었다. 배양된 세포는 2% paraformaldehyde로 고정하고, BD

Perm/Wash™ buffer(BD Biosciences)로 permeabilization하여 항-CD19(PE), IL-10(APC), IFN- $\gamma$ (FITC) 항체 또는 isotype control 항체로 염색하였다. 샘플은 BD LSRII flow cytometer를 이용하여 수집되었고, 데이터는 FlowJo® 9.6 software(Tree Star, Ashland, OR, USA)를 이용하여 분석하였다.

또한 GolgiStop™ 존재하에 PMA와 ionomycin으로 자극을 주기 전 배양액을 회수하여 배양액으로 분비한 IL-10, IFN- $\gamma$  그리고 TNF- $\alpha$ 를 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA, R&D systems, Minneapolis, MN, USA)을 이용하여 제조회사의 사용법에 따라 수행하였다.

## 5. 세포증식 측정

FACS Aria로 분리한 effector T 세포(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>)를 3  $\mu$ M carboxyfluoresceindiacetate(CFSE, Life Technologies)로 표지하였다. CFSE 표지된 T 세포를 분리한 B 세포와 1:1의 비율로 96-well flat bottom plate에 미리 배양 되어있던 CD154-L 세포와 항-CD3(5  $\mu$ g/ml), 항-CD28(10  $\mu$ g/ml)과 함께 5 일 동안 배양하였다. 샘플은 BD LSRII flow cytometer를 이용하여 수집되었고, 데이터는 CFSE가 염색된 세포들을 gating하여 FlowJo® 9.6 software를 이용하여 분석하였다.

## 6. 통계분석

데이터는 평균  $\pm$  표준오차(means  $\pm$  standard error of mean, SEM)로 나타내었다. 통계 분석은 GraphPad Prism(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 unpaired two-tailed student's *t* test를 통해 통계처리 하였다. P 값이 0.05 미만에 대해서만 통계적 의미가 있으므로 해석하였다.

## 결 과

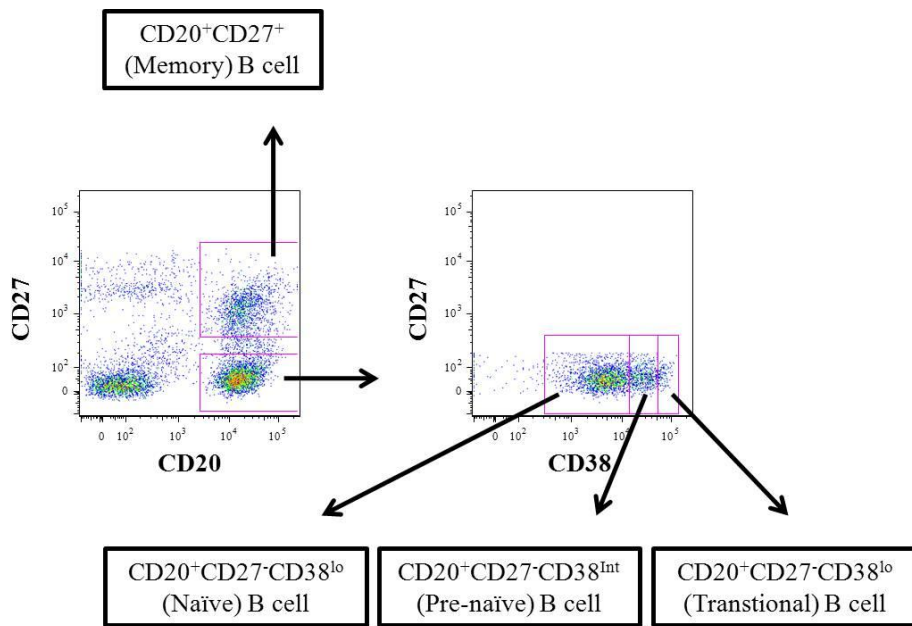
### 1. Pre-naïve B세포는 CD40 자극을 주었을 때 IL-10을 생성함

pre-naïve B 세포는  $CD5^+CD38^{Int}$ 로 표현되는 특징을 갖는다(28). 즉, 사람의 말초혈액 내 B 세포를 CD38의 발현에 따라 발달단계 상으로 구분 가능하며(33),  $CD38^{hi}$ 는 transitional B 세포,  $CD38^{Int}$ 는 pre-naïve B 세포,  $CD38^{lo}$ 인 naïve B 세포로 나눌 수 있다. 이 조건으로 세포를 분리하여 실험에 사용하였고, 본 실험에서는 pre-naïve B 세포( $CD20^+CD27^-CD38^{Int}$ )의 기능을 분석하기 위해서 대조군으로 naïve B 세포( $CD20^+CD27^-CD38^{lo}$ ), memory B 세포( $CD20^+CD27^+$ )를 사용하였다(Fig. 1).

Gary-Gouy 등은(32) 사람의 말초혈액 내 CD5를 발현하는 B 세포가 항-염증성 cytokine인 IL-10을 생성 한다고 보고하였기에, CD5를 발현하는 pre-naïve B 세포가(28) IL-10을 생성하는지 분석하였다. 분리한 B 세포를 CD154-L 세포와 같이 배양하여 CD40 자극 조건에서 세포 내 IL-10 생성량을 flow cytometry로 확인하였다. 그 결과 pre-naïve B 세포( $7.069 \pm 2.996\%$ )가 다른 naïve B 세포( $2.489 \pm 0.555\%$ ,  $p < 0.001$ )와 memory B 세포( $1.428 \pm 0.839\%$ ,  $p < 0.001$ )에 비해 의미있게 많은 IL-10을 발현하였다(Fig. 2A-B). 또한 배양액에 있는

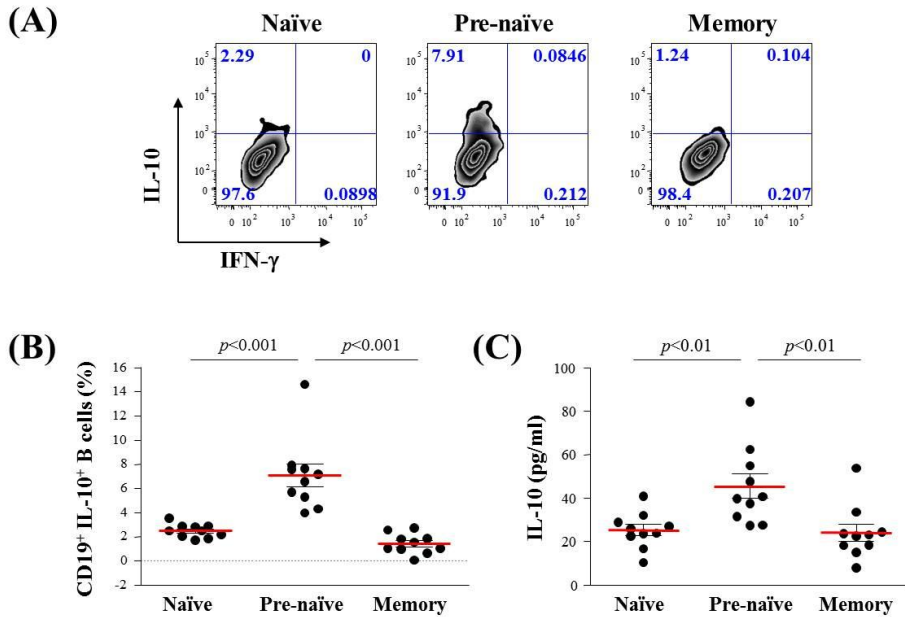
IL-10 양을 ELISA로 확인한 결과, pre-naïve B 세포( $45.40 \pm 17.75$  ng/ml)가 naïve B 세포( $25.20 \pm 8.26$  ng/ml,  $p < 0.01$ )와, memory B 세포( $24.05 \pm 12.39$  ng/ml,  $p < 0.01$ )에 비해서 의미있게 많은 IL-10을 분비하였다(Fig. 2C).





**Figure 1. Sorting scheme of pre-naïve B cells.**

B cells were enriched using RosetteSep-Human B cell enrichment cocktail from healthy peripheral blood. Enriched B cells were stained with anti-human CD20, CD27, and CD38 Abs and then sorted into naïve, pre-naïve, and memory B cells by FACS Aria.



**Figure 2. IL-10-producing B cells are enriched within pre-naïve B cells population in healthy subjects.**

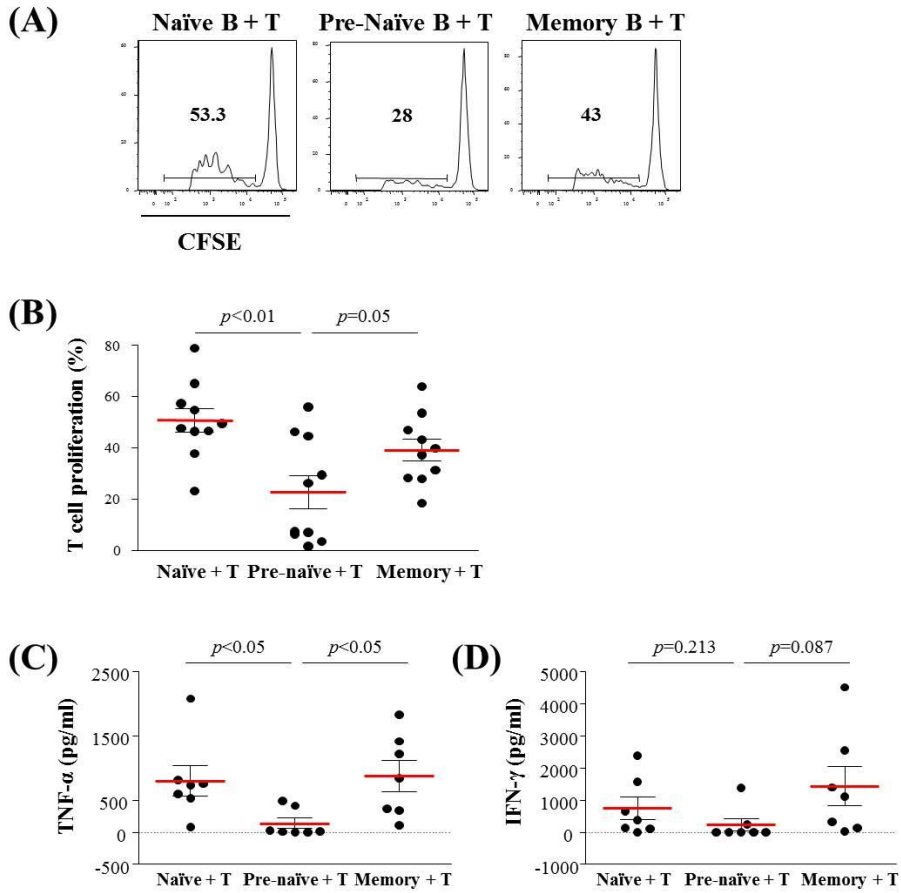
B cells were sorted into naïve, pre-naïve, and memory B cells from healthy subject. Sorted B cells were incubated for 72 hr with human CD154-expressing L cells and then stimulated with PMA and ionomycin in the presence of GolgiStop™ for last 6 hr end of the culture. In order to stain the intracellular cytokine, cells were then stained with anti-human CD19, IL-10, and IFN- $\gamma$  Abs. (A) Representative plot showing the frequency of IL-10-producing cells by three B-cell subsets as indicated. (B) Bar graph is cumulative results from ten independent experiments (n=10) and indicate

means  $\pm$  SEM percentages of IL-10<sup>+</sup> cells for naïve, pre-naïve, and memory B cells. (C) Supernatants from different sorted B-cell subsets were measured by ELISA for IL-10 prior to stimulation with PMA and ionomycin. Data are the means  $\pm$  SEM of ten experiments. *p*-values were obtained using unpaired two-tailed Student's *t*-test compared with pre-naïve B cells.

## 2. Pre-naïve B 세포가 CD4<sup>+</sup> T 세포의 증식 및 cytokine 을 억제함.

Pre-naïve B 세포가 IL-10을 매개로 면역반응을 조절하는 기능을 갖는지 확인하기 위해 다음 실험을 진행하였다. T 세포의 증식을 CFSE 염색을 통해 flow cytometry로 확인한 결과, pre-naïve B 세포와 배양한 T 세포( $22.82 \pm 20.39\%$ )의 세포증식이 naïve B 세포(증식된 세포 빈도,  $50.71 \pm 14.99\%$ ,  $p<0.01$ ) 및 memory B 세포( $39.06 \pm 13.47\%$ ,  $p=0.05$ )와 배양한 T 세포에 비해 세포증식이 의미있게 억제되었다(Fig. 3A-B).

B 세포와 T 세포를 5일 동안 배양한 배양액에서 TNF- $\alpha$ 의 분비도를 확인한 결과, pre-naïve B 세포와 배양한 T 세포( $137 \pm 215.3$  pg/ml)에서 naïve B 세포와 배양한 T 세포( $801 \pm 615.9$  pg/ml,  $p<0.05$ ) 및 memory B 세포와 배양한 T 세포( $874.1 \pm 640.9$  pg/ml,  $p<0.05$ )에 비해 TNF- $\alpha$  생성이 의미있게 감소하였다(Fig. 3C-D). 또한 IFN- $\gamma$ 의 경우, pre-naïve B 세포와 배양한 T 세포( $232.1 \pm 517.2$  pg/ml)에서 naïve B 세포와 배양한 T 세포( $749.3 \pm 903.3$  pg/ml,  $p=0.213$ ) 및 memory B 세포와 배양한 T 세포( $1,435 \pm 1,625$  pg/ml,  $p=0.087$ )에 비해 통계적인 의미는 없었지만 IFN- $\gamma$  생성이 감소하였다.



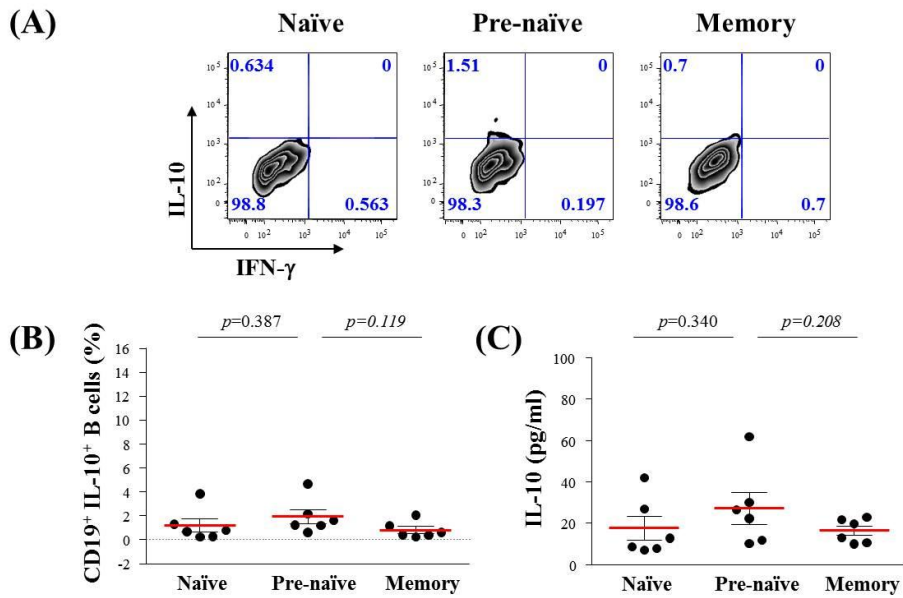
**Figure 3. Pre-naïve B cells suppressed proliferation and cytokine production of CD4<sup>+</sup> T cells.**

Human CD154-expressing L cells were irradiated (60Gy) and then cultured with CFSE-labeled autologous CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells and sorted B-cell subsets from healthy individuals at a ratio of 1:1 for 5 days in the presence of soluble anti-CD3 (5  $\mu$ g/ml) and anti-CD28 (10  $\mu$ g/ml) mAbs. (A) Representative histograms showing the dilution of CFSE after CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T

cells were co-cultured with B-cell subsets. (B) Bar graph shows cumulative data from ten independent experiments (n=10) as means  $\pm$  SEM percentages. (C, D) The amounts of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  were measured by ELIA in the supernatants from the (B) and data represent the means  $\pm$  SEM of seven experiments. *p*-values were obtained using unpaired two-tailed Student's *t*-test compared with pre-naïve B cells.

### 3. 루푸스 환자의 pre-naïve B 세포는 IL-10을 적게 생성함.

정상인의 말초혈액에서 분리한 pre-naïve B 세포가 다른 B 세포에 비해서 IL-10 생성이 높기에 루푸스 환자에서 분리한 pre-naïve B 세포도 비교하고자 실험하였다. 루푸스 환자의 말초혈액에서 분리한 각각의 B 세포 그룹이 생성하는 IL-10 양을 flow cytometry로 확인한 결과, pre-naïve B 세포( $1.918 \pm 1.432\%$ )의 IL-10 생성이 naïve B 세포( $1.188 \pm 1.360\%$ ,  $p=0.387$ ) 및 memory B 세포( $0.812 \pm 0.687\%$ ,  $p=0.119$ )와 비교하여 차이가 없었으며, 정상인의 pre-naïve B 세포에 비하면 IL-10 발현이 상당히 미비 하였다(Fig. 4A-B). 배양액에 있는 IL-10 양을 ELISA를 통해 확인한 결과에서도 pre-naïve B 세포( $27.23 \pm 18.72$  pg/ml)의 배양액에서 IL-10 양은 naïve B 세포( $17.67 \pm 14.02$  pg/ml,  $p=0.340$ ) 및 memory B 세포( $16.45 \pm 5.80$  pg/ml,  $p=0.208$ )간에 차이가 없었다.



**Figure 4. Pre-naïve B cells from SLE patients were defect in producing IL-10.**

Sorted B cells from patients with SLE were cultured with 60 Gy irradiated human CD154-expressing L cells at a ratio of 1:10 (L cells:B cells) for 72 hr. PMA, ionomycin and GolgiStop were added for last 6 hr end of the culture and then cells were stained with anti-CD19, IL-10, and IFN- $\gamma$  mAbs.

(A) Representative plot showing the frequency of IL-10<sup>+</sup> B cells from each B-cell subsets. (B) Cumulative results from six independent experiments. (C)

The amount of IL-10 was measured by ELISA in the supernatants from different sorted B-cell subsets prior to stimulation with PMA and ionomycin.

Data represent the means  $\pm$  SEM.  $p$ -values were obtained using unpaired



two-tailed Student's  $t$ -test compared with pre-naïve B cells.

## 고 찰

지금까지 면역반응의 조절에 대한 연구는 주로  $CD4^+$  조절 T 세포( $CD4^+$  regulatory T, Treg)에 대해서 연구되었다(34, 35). 하지만 최근 사람의 말초혈액에서  $CD4^+$ 조절 T 세포 이외에 B 세포 또한 면역 반응을 조절할 수 있다는 연구가 보고 되었다(21, 22). 생쥐와 사람의 조절 B 세포는 IL-10을 매개로 면역반응을 조절하는 역할을 하는 것으로 밝혀져 있고, 특히 사람의 말초혈액에서 발견된 기억 세포의 한 부분에 속하는  $CD24^{hi}CD27^+$  B10 세포와 immature한 B 세포인  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  B 세포가 항-염증성 cytokine 중 하나인 IL-10을 매개로  $CD4^+$  T 세포의 cytokine 생성을 억제함이 밝혀졌다(21, 22). 또한 사람의 말초혈액 내 CpG 자극에 의해 IL-10이 생성 가능한 B 세포 그룹이 있으며, 이 세포들은  $CD4^+$  T 세포의 증식까지도 억제한다는 현상을 보여 주고 있지만 정확히 어느 세포가 이러한 일을 하는지는 밝혀져 있지 않다(36).

본 논문에서는  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  B 세포와 유사한  $CD5^+CD20^+CD27^+CD38^{int}$ 인 pre-naïve B 세포가 immature B 세포인 동시에 IL-10 매개 하에 면역을 조절할 수 있는 조절 세포라는 것을 시험관내 억제시험을 통해 그 근거를 제시하였다. 사람의

말초혈액에 있는 백혈구 중 약 20%가 CD19<sup>+</sup> B 세포고, 이 CD19<sup>+</sup> B 세포 속에 pre-naïve B 세포는 약 7%를 차지하는 것으로 알려져 있다(28). 이 pre-naïve B 세포는 B 세포 발달단계 상 존재하는 세포인 동시에 CD40에 대한 자극을 주었을 때 naïve B 세포나 memory B 세포에 비해 IL-10을 많이 생성하는 것을 확인함으로서(Fig. 2), 조절 B 세포의 기능을 가질 수 있고 CD4<sup>+</sup> T세포의 증식과 cytokine 생성을 조절하는 것을 확인하였다(Fig. 3).

조절 B 세포의 다른 면역 조절 기전을 보면 그 매카니즘에 있어 IL-10 이외에도 중요하게 작용하는 분자로 CD80, CD86이 있다. 생쥐의 장내염증 TCR $\alpha$  KO 모델에서 B 세포의 면역억제 작용에 CD86이 역할을 한다고 보고 되었고(37, 38), 조절 T 세포에서도 CD80의 작용을 저해하면 면역억제 효능이 감소하는 것으로 알려져 있다(37). 실제로 사람의 CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B 세포가 IL-10 매개 하에 면역억제 기능을 하지만, CD80과 CD86에 대한 항체로 연구한 결과 CD80과 CD86도 이 세포의 면역억제 작용을 매개하는 것으로 밝혀졌다(22). 따라서 pre-naïve B 세포 역시 IL-10 뿐만 아니라 CD80, CD86에 의해서도 면역 조절이 일어나는 것인지에 대한 추가 기전연구가 필요하다.

대표적 자가면역질환 중 하나인 루푸스는 B 세포가

생성하는 항체의 매개로 질병이 생기는 전신적 질환으로 면역복합체(immune complex)가 장기에 침착되어 염증을 유발하고, 궁극적으로 장기의 기능을 손상시킨다. 이는 B 세포의 비정상적 활성화와 자가항체의 생성이 가장 큰 원인으로 알려져 있다(39). 이러한 자가항원에 반응하는 비정상적인 B 세포는 여러 발달단계를 거치면서 면역 관용기전에 의해서 제거되지만, 루푸스와 같은 질환에서는 면역 관용기전이 정상적으로 작동하지 않아 자가항원에 반응하는 autoreactive 한 B 세포가 제거되지 않기 때문에 질환을 일으키는 것으로 추정되고 있다(40, 41). 흥미롭게도 루푸스 환자의 말초혈액 내의 immature B 세포인  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  B 세포와 pre-naïve B 세포 역시 수가 증가되어 있고(22, 28),  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  B 세포는 STAT-3의 인산화관련 신호전달 분자의 이상으로 건강한 사람에 비해 IL-10을 거의 생성하지 못함이 밝혀졌다. 본 연구에서도 루푸스 환자의 pre-naïve B 세포의 경우 IL-10 생성이 정상에 비해서 떨어져 있기에 어떤 기전으로 IL-10 생성에 결함이 있는지 향후 연구에서 그 기전을 밝히고자 한다.

종합하면, 사람의 말초혈액 내 B 세포의 발달과정 중에 있는 pre-naïve B 세포는 IL-10을 매개로 조절 세포로서의 역할을 하는 세포임을 보였다. 하지만, 루푸스 환자의 pre-naïve B 세포는

정상인에 비해서 수는 증가된 반면 IL-10 발현이 저하됨을 확인하였다. 따라서 면역억제 기능이 저하된 pre-naïve B 세포가 루푸스의 발병에 중요한 역할을 할 것임을 시사한다. 면역관용에 중요한 pre-naïve B 세포가 증가된 이유와 조절 B 세포로의 기능이 저하된 기전을 밝힐 수 있다면 자가면역질환의 하나인 루푸스 치료의 근거를 제공할 것으로 기대한다.

## 참 고 문 헌

1. Monroe JG, Dorshkind K. Fate decisions regulating bone marrow and peripheral B lymphocyte development. *Advances in immunology*. 2007;95:1-50. PubMed PMID: 17869609.
2. Allman D, Srivastava B, Lindsley RC. Alternative routes to maturity: branch points and pathways for generating follicular and marginal zone B cells. *Immunological reviews*. 2004 Feb;197:147-60. PubMed PMID: 14962193.
3. Wardemann H, Nussenzweig MC. B-cell self-tolerance in humans. *Advances in immunology*. 2007;95:83-110. PubMed PMID: 17869611.
4. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):1570-80. PubMed PMID: 18725575. Pubmed Central PMCID: 2518873.
5. Bryant A, Moore J. Rituximab and its potential for the treatment of rheumatoid arthritis. *Therapeutics and clinical risk management*. 2006 Jun;2(2):207-12. PubMed PMID: 18360594. Pubmed Central PMCID: 1661661.
6. Neta R, Salvin SB. Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity. *Journal of immunology*. 1974 Dec;113(6):1716-25. PubMed PMID: 4279260.
7. Katz SI, Parker D, Turk JL. B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature*. 1974 Oct 11;251(5475):550-1. PubMed PMID: 4547522.
8. Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA, Jr. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*. 1996 Dec 1;184(6):2271-8. PubMed PMID: 8976182. Pubmed Central PMCID: 2196394.
9. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Smith RN, Preffer FI, Bhan AK. Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice. *The Journal of experimental medicine*. 1997 Nov 17;186(10):1749-56. PubMed PMID: 9362534. Pubmed Central PMCID: 2199135.
10. Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature immunology*. 2002 Oct;3(10):944-50. PubMed PMID: 12244307.
11. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*. 2002 Feb;16(2):219-30. PubMed PMID: 11869683.
12. Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *The Journal of experimental medicine*. 2003 Feb 17;197(4):489-501. PubMed PMID: 12591906. Pubmed Central PMCID: 2193864.
13. Watanabe R, Fujimoto M, Ishiura N, Kuwano Y, Nakashima H, Yazawa N, et al. CD19 expression in B cells is important for suppression of

- contact hypersensitivity. *The American journal of pathology*. 2007 Aug;171(2):560-70. PubMed PMID: 17556590. Pubmed Central PMCID: 1934538.
14. Carroll MC, Prodeus AP. Linkages of innate and adaptive immunity. *Current opinion in immunology*. 1998 Feb;10(1):36-40. PubMed PMID: 9523108.
  15. Silverman GJ, Srikrishnan R, Germar K, Goodyear CS, Andrews KA, Ginzler EM, et al. Genetic imprinting of autoantibody repertoires in systemic lupus erythematosus patients. *Clinical and experimental immunology*. 2008 Jul;153(1):102-16. PubMed PMID: 18510544. Pubmed Central PMCID: 2432104.
  16. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, Fujimoto M, Tedder TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *The Journal of clinical investigation*. 2008 Oct;118(10):3420-30. PubMed PMID: 18802481. Pubmed Central PMCID: 2542851.
  17. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*. 2008 May;28(5):639-50. PubMed PMID: 18482568.
  18. Gray M, Miles K, Salter D, Gray D, Savill J. Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007 Aug 28;104(35):14080-5. PubMed PMID: 17715067. Pubmed Central PMCID: 1955797.
  19. Lenert P, Brummel R, Field EH, Ashman RF. TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production. *Journal of clinical immunology*. 2005 Jan;25(1):29-40. PubMed PMID: 15742155.
  20. Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, et al. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *Journal of immunology*. 2007 Jun 15;178(12):7868-78. PubMed PMID: 17548625.
  21. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):530-41. PubMed PMID: 20962324. Pubmed Central PMCID: 3031478.
  22. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 2010 Jan 29;32(1):129-40. PubMed PMID: 20079667.
  23. Herzenberg LA, Stall AM, Lalor PA, Sidman C, Moore WA, Parks DR, et al. The Ly-1 B cell lineage. *Immunological reviews*. 1986 Oct;93:81-102. PubMed PMID: 3096879.
  24. Stall AM, Adams S, Herzenberg LA, Kantor AB. Characteristics and development of the murine B-1b (Ly-1 B sister) cell population. *Annals of the*

- New York Academy of Sciences. 1992 May 4;651:33-43. PubMed PMID: 1376053.
25. O'Garra A, Chang R, Go N, Hastings R, Haughton G, Howard M. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *European journal of immunology*. 1992 Mar;22(3):711-7. PubMed PMID: 1547817.
  26. Lundy SK. Killer B lymphocytes: the evidence and the potential. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society* [et al]. 2009 Jul;58(7):345-57. PubMed PMID: 19262989. Pubmed Central PMCID: 2892642.
  27. Correale J, Farez M, Razzitte G. Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells. *Annals of neurology*. 2008 Aug;64(2):187-99. PubMed PMID: 18655096.
  28. Lee J, Kuchen S, Fischer R, Chang S, Lipsky PE. Identification and characterization of a human CD5+ pre-naïve B cell population. *Journal of immunology*. 2009 Apr 1;182(7):4116-26. PubMed PMID: 19299709.
  29. Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*. 2005 Jun 1;105(11):4390-8. PubMed PMID: 15701725. Pubmed Central PMCID: 1895038.
  30. Bofill M, Janossy G, Janossa M, Burford GD, Seymour GJ, Wernet P, et al. Human B cell development. II. Subpopulations in the human fetus. *Journal of immunology*. 1985 Mar;134(3):1531-8. PubMed PMID: 3871452.
  31. Nisitani S, Murakami M, Akamizu T, Okino T, Ohmori K, Mori T, et al. Preferential localization of human CD5+ B cells in the peritoneal cavity. *Scandinavian journal of immunology*. 1997 Dec;46(6):541-5. PubMed PMID: 9420615.
  32. Gary-Gouy H, Harriague J, Bismuth G, Platzer C, Schmitt C, Dalloul AH. Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production. *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4537-43. PubMed PMID: 12393419.
  33. Hystad ME, Myklebust JH, Bo TH, Sivertsen EA, Rian E, Forfang L, et al. Characterization of early stages of human B cell development by gene expression profiling. *Journal of immunology*. 2007 Sep 15;179(6):3662-71. PubMed PMID: 17785802.
  34. Belkaid Y, Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (\*). *Annual review of immunology*. 2009;27:551-89. PubMed PMID: 19302048.
  35. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature reviews Immunology*. 2010 Jul;10(7):490-500. PubMed PMID: 20559327.
  36. Bouaziz JD, Calbo S, Maho-Vaillant M, Saussine A, Bagot M, Bensussan A, et al. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *European journal of immunology*. 2010 Oct;40(10):2686-91. PubMed PMID: 20809522.
  37. Mann MK, Maresz K, Shriver LP, Tan Y, Dittel BN. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for



- recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology*. 2007 Mar 15;178(6):3447-56. PubMed PMID: 17339439.
38. Mizoguchi E, Mizoguchi A, Preffer FI, Bhan AK. Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. *International immunology*. 2000 May;12(5):597-605. PubMed PMID: 10784605.
39. Jacob N, Stohl W. Autoantibody-dependent and autoantibody-independent roles for B cells in systemic lupus erythematosus: past, present, and future. *Autoimmunity*. 2010 Feb;43(1):84-97. PubMed PMID: 20014977. Pubmed Central PMCID: 2809122.
40. Yurasov S, Hammersen J, Tiller T, Tsuiji M, Wardemann H. B-cell tolerance checkpoints in healthy humans and patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005 Dec;1062:165-74. PubMed PMID: 16461799.
41. Meffre E, Wardemann H. B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Current opinion in immunology*. 2008 Dec;20(6):632-8. PubMed PMID: 18848883.

## **Abstract**

A distinct pre-naïve B cell population circulating in human peripheral blood that exhibits an intermediate phenotype between transitional and naïve B cells has been known. However, their functions other than a developmental intermediate remain still elusive. Transitional 2-marignal zone precursor (T2-MZP) B cells in mice, which are at similar developmental stage as human pre-naïve B cells, have been demonstrated to exert immunosuppressive functions of IL-10 producing regulatory B cells (Bregs). This study was conducted to address the question that pre-naïve B cells have functional properties of Bregs by producing IL-10 and inhibition of T cell proliferation and cytokine production.

As results, pre-naïve B cells preferentially produce IL-10 upon CD40 engagement compared with naïve and memory B cells. In addition, pre-naïve B cells suppressed CD4<sup>+</sup> T cell activation by inhibiting proliferation and cytokine production. However, pre-naïve B cells from systemic lupus erythematosus (lupus or SLE) patients were refractory to CD40 stimulation and defective in production of IL-10. Pre-naïve B cells are unique B cell population in human peripheral blood that may play a role of Breg cells. These cells may play an important role in maintaining self-tolerance in the

periphery.